SCARLET NERE ORTEGA

Análise de estatinas em plasma humano utilizando microextração por dispositivo preenchido com sorvente (MEPS) e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS)

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Química Analítica e Inorgânica

Orientador: Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças

SÃO CARLOS

2013

DEDICATÓRIA

*Dedico essa dissertação à minha família por
todo amor e apoio incondicional.*

*Aos meus pais, Antonio e Percília por me
ensinarem a ser dedicada e lutar pelos meus
sonhos. Ao meu irmão, Hebert, pelo
incentivo a sempre continuar buscando
conhecimento. Ao meu noivo, Eduardo, pelo
incentivo, por me ajudar a superar os
contratempos e por me fazer feliz. A minha
cunhada Gabriela e meus sobrinhos Kevin e
Giovanni por tornar meus dias de descanso
os mais prazerosos.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família e amigos, Antonio, Percília, Hebert, Eduardo, Gabriela, Sérgio, Mariângela, Tiago, Imyra e Luiz, que estão sempre ao meu lado me apoiando e me incentivando.

Ao professor Dr. Fernando Mauro Lanças pela oportunidade de realizar esse trabalho, pela orientação e por ter apoiado as minhas iniciativas durante a realização do projeto.

Ao professor Dr. Álvaro José dos Santos-Neto pela imensa colaboração no trabalho tanto pelo desenvolvimento do dispositivo de extração quanto por ter cedido seu tempo para discussões durante o desenvolvimento do trabalho.

Ao professor Dr. Anil Kumar Singh pelo fornecimento dos padrões analíticos e a Casa de Saúde de São Carlos pelo fornecimento de amostras de plasma.

A todos os colegas do Laboratório de Cromatografia, Paulo, Carlos, Meire, Maraíssa, Maura, Felipe, Raquel, Tanare, Andréia, Leidimara, Elaine, Guilherme e Odete, pelas contribuições, incentivos e pelos momentos de descontração.

Aos funcionários da biblioteca e da secretaria de pós-graduação do IQSC por toda ajuda.

Finalmente agradeço à CNPQ pela bolsa de mestrado, à CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro aos projetos do laboratório e ao IQSC pelo apoio institucional.

RESUMO

As elevadas taxas de colesterol plasmático representam um grande risco à saúde, uma vez que podem causar doenças cardiovasculares. Para o tratamento e prevenção da dislipidemia são utilizados medicamentos reguladores do colesterol, como as estatinas. Embora eficazes e extensamente utilizados, esses fármacos apresentam efeitos adversos se administrados na dosagem errada. Assim, faz-se necessário o desenvolvimento de um método de monitorização terapêutica a fim de se ajustar a concentração desses compostos no sangue. Este trabalho visa o desenvolvimento de um método para análise de pravastatina (PRA), atorvastatina (AT), fluvastatina (FLV) e sinvastatina (SV) em plasma humano usando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS). Na etapa de preparo de amostras, de forma inédita, utilizou-se a técnica microextração por sorvente empacotado (MEPS) para a análise de plasma humano contendo quatro estatinas. Para a otimização das condições de extração avaliaram-se, por experimentos univariados, parâmetros como fase extratora, composição do solvente de eluição e de lavagem. Outros fatores como volume de amostra, ciclos de amostragem, ciclos de eluição e etapas de eluição foram avaliados empregando-se planejamento experimental multivariado. A extração foi realizada utilizando-se uma fase estacionária C18 Chromabond como sorvente. O método MEPS-LC-MS/MS desenvolvido foi validado baseando-se nas recomendações da agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA) e apresentou linearidade, seletividade, precisão, exatidão e recuperação adequadas para as estatinas, excetuando-se para a sinvastatina. A faixa de linearidade obtida foi de 10-200 ng mL⁻¹ (FLV e AT) e 20-200 ng mL⁻¹ (PRA). Os limites de quantificação obtidos foram da ordem de 10 ng mL⁻¹ (AT e FLV) e 20 ng mL⁻¹ (PRA). Desta forma o método desenvolvido poderá ser utilizado para a determinação dos níveis de pravastatina, fluvastatina e atorvastatina em amostras de plasma humano.

ABSTRACT

Elevated plasma cholesterol level is a risk factor for coronary diseases, which are the most deadly sickness according to the World Health Organization (WHO). In order to fight the hypercholesterolemia in patients, statins are a well-established class of drugs to be prescribed. Even though they are efficient, some side effects can be associated with statin therapy, especially when interactions with other drugs occur. In these cases, monitoring the concentration can optimize the drug dosage to therapeutic effectiveness whilst minimizing the adverse effects. The aim of this work was to develop a method for analysis of pravastatin (PRA), atorvastatin (AT), fluvastatin (FLV) and simvastatin (SV) in human plasma. The experimental means chosen to attain the goal was liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and for the sample preparation, microextraction by packed sorbent (MEPS). To optimize the extraction conditions, parameters such as sorbent, elution and washing solution were evaluated. Other parameters such as sampling, elution cycles, sample volume and elution steps were evaluated using multivariate experimental design. The extraction was performed using C18 Chromabond as sorbent. The method was validated based on ANVISA recommendations and featured appropriated linearity, selectivity, accuracy, precision, and recovery, except for simvastatin. The calibration curve in plasma was obtained in the concentration range 10-200 ng mL⁻¹ (FLV and AT) and 20-200 ng mL⁻¹ (PRA) and the limit of quantification (LOQ) was 10 ng mL⁻¹ (FLV and AT) and 20 ng mL⁻¹ (PRA). The method developed proved to be suitable for the analysis of pravastatin, fluvastatin and atorvastatin in human plasma sample, but not simvastatin, and it can contribute to a more efficient usage of the statins in the treatment of hypercholesterolemia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Classificação das técnicas de extração de acordo com a natureza do solvente empregado.....	15
Figura 2. A) Foto de uma seringa de MEPS B) Figura esquemática do dispositivo de extração acoplado à agulha do sistema para MEPS.....	16
Figura 3. Esquema de utilização do sistema de MEPS.....	17
Figura 4. Fórmula estrutural das estatinas mais comuns	21
Figura 5. Síntese do colesterol inibida pela ação das estatinas que inibem a HMG-CoA redutase.	21
Figura 6. Esquema do experimento de eluição contínua. Apenas uma extração foi realizada.....	28
Figura 7. Esquema do teste de eluição completo, no qual foram realizadas 9 extrações. X refere-se à proporção tampão:acetonitrila utilizada nos experimentos (90:10; 80:20; 70:30; 60:40; 50:50; 40:60; 30:70; 20:80 e 10:90, v/v)	29
Figura 8. Esquema dos experimentos de recuperação e efeito matriz, onde (A) representa solução de eluição fortificada com 200 ng mL ⁻¹ de estatinas, (B) fortificação do extrato com 200 ng mL ⁻¹ de estatinas e (C) matriz fortificada com 200 ng mL ⁻¹ de estatinas antes de passar pelo processo de extração.....	32
Figura 9. Gráfico com gradiente de eluição de acetonitrila e tampão formiato de amônio 5 mM pH= 4,5 como fase móvel, a uma vazão de 0,5 mL/min para análises realizadas em UPLC Acquity (Waters).	34
Figura 10. Cromatograma do íon extraído no modo MS de solução padrão de estatinas (1 mg L ⁻¹). (PRA) Pravastatina, (FLV) Fluvastatina, (AT) Atorvastatina, e (SV) Simvastatina obtidos por LC-ESI-TOFMS. Condições de análise descritas no item 3.5.3.....	39
Figura 11. Gráfico da eficiência de extração para cada estatina utilizando-se diferentes fases extratoras.	40
Figura 12. Gráficos de recuperação pela porcentagem de solvente orgânico obtidos no teste de eluição contínuo. As figuras A e B apresentam os gráficos correspondentes ao teste com a fase C18 Chromabond com acetonitrila e metanol respectivamente. As figuras C e D apresentam os gráficos correspondentes ao teste com a fase HLB Oasis com acetonitrila e metanol respectivamente.....	41
Figura 13. Gráficos de recuperação pela porcentagem de solvente orgânico obtidos no teste de eluição contínuo. (A) e (B): gráficos correspondentes ao teste com a fase C18 Chromabond com acetonitrila e metanol respectivamente. (C) e (D) gráficos	

correspondentes ao teste com a fase HLB Oasis com acetonitrila e metanol respectivamente.	42
Figura 14. Gráfico do teste de eluição completo utilizando C18 Chromabond como fase extratora e solvente de eluição composto de acetonitrila: tampão formiato de amônio (5 mM) em pH 4,5.	43
Figura 15. Diagramas de Pareto do planejamento fatorial completo 2^2 , no qual foram avaliados o volume de amostra (100-200 μ L) e o número de ciclos aspirar/dispensar (4-8). A. Pravastatina; B. Atorvastatina, C. Fluvastatina e D. Sinvastatina.	44
Figura 16. Gráfico de superfície de resposta obtido pelo planejamento 2^2 com ponto central para pravastatina, fluvastatina, atorvastatina e sinvastatina.	45
Figura 17. Diagramas de Pareto do planejamento fatorial completo 2^2 , no qual foram avaliados o volume de amostra (150-250 μ L) e o número de ciclos aspirar/dispensar (6-10). A. Pravastatina; B. Atorvastatina, C. Fluvastatina e D. Sinvastatina.	46
Figura 18. Gráfico de superfície de resposta obtido pelo planejamento 2^2 da etapa de eluição para a pravastatina, atorvastatina e sinvastatina.	47
Figura 19. Gráfico de superfície de resposta obtido pelo planejamento 2^2 da etapa de amostragem para a fluvastatina	47
Figura 20. Diagramas de Pareto do planejamento fatorial completo 2^2 , no qual foram avaliados o número de ciclos de eluição (4-8) e etapas de eluição (1-2). A. Pravastatina; B. Atorvastatina, C. Fluvastatina e D. Sinvastatina.	50
Figura 21. Cromatogramas das soluções de estatina na concentração do LOQ (à esquerda)	51
Figura 22. Gráfico de resíduo relativo vs concentração para a pravastatina.	53
Figura 23. Gráfico de resíduo relativo vs concentração para a atorvastatina.	53
Figura 24. Gráfico de resíduo relativo vs concentração para a fluvastatina.	53
Figura 25. Gráfico de resíduo relativo vs concentração para a sinvastatina.	54
Figura 26. Efeito dos parâmetros avaliados na robustez para concentração dos analitos.	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Comparação entre características das técnicas MEPS, SPME e SPE.....	16
Tabela 2. Planejamento fatorial completo (2^2) utilizado na otimização da etapa de amostragem	30
Tabela 3. Planejamento fatorial completo (2^2) utilizando valores mais altos para os níveis de cada variável seguindo resultados obtidos no planejamento anterior.....	30
Tabela 4. Tabela com os experimentos realizados para avaliação da recuperação e efeito matriz.....	31
Tabela 5. Planejamento fatorial completo (2^2) utilizado para otimização da etapa de eluição.....	33
Tabela 6: Valores das concentrações utilizadas na avaliação da linearidade.....	36
Tabela 7: Fatores avaliados na robustez e matriz de Youden.....	38
Tabela 8: Avaliação da temperatura na extração dos analitos.....	48
Tabela 9: Teste Anova (dois fatores) para experimentos com número de ciclos de amostragem e temperatura de incubação diferentes.	49
Tabela 10: Avaliação do efeito matriz na extração dos analitos.....	49
Tabela 11: Tabela com os dados de linearidade para os fármacos analisados	52
Tabela 12: Dados Farmacocinéticos de algumas estatinas *.	54
Tabela 13: Dados obtidos para estudo da precisão intra-dia e inter-dia dos fármacos estudados.....	55
Tabela 14: Dados obtidos para estudo de exatidão intra-dia e inter-dia dos fármacos estudados.....	55
Tabela 15: Dados obtidos da recuperação para as estatinas estudadas	56
Tabela 16: Dados obtidos nos experimentos para avaliação da reprodutibilidade intralaboratorial.....	57
Tabela 17: Dados obtidos para avaliação da robustez.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN – Acetonitrila

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASE – Extração acelerada com solvente

AT – Atorvastatina

C_{máx} – Concentração máxima

CV – Coeficiente de variação

DP – Desvio padrão

FLV – Fluvastatina

GC – Cromatografia gasosa

HMG-CoA redutase – 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

LC – Cromatografia líquida

LDL – Lipoproteínas de baixa densidade

LLE – Extração líquido-líquido

LOD – Limite de detecção

LOQ – Limite de quantificação

LPME – Microextração em fase líquida

LSE – Extração líquido-sólido

ME – Efeito matriz

MEPS – Microextração por dispositivo preenchido ou “empacotado” com sorvente

MIP – Polímero molecularmente impresso

MS – Espectrômetro de massas ou espectrometria de massas

OMS – Organização Mundial de Saúde

PE – Eficiência de extração

PI – Padrão interno

PRA – Pravastatina

PTFE- Politetrafluoroetileno

R – Grupo alquílico

RAM – Meios de acesso restrito (*restricted access media*)

RE – Recuperação

ROS – Rosuvastatina

SCX – Ácido benzenossulfônico

SBSE – Extração por barra de agitação

S_{Di} – Desvio padrão das diferenças

SFE – Extração com fluido supercrítico

SPE – Extração em fase sólida

SPME – Microextração em fase sólida

SRM – Monitoramento de reações selecionadas (*Selection reaction monitoring*)

Sub-SFE – Extração com fluido subcrítico

SV – Sinvastatina

TDM – monitorização terapêutica

T_{máx} – Tempo após a ingestão de medicamento quando a concentração é máxima

UHPLC – Cromatografia líquida de ultra eficiência (*Ultra high-performance liquid chromatograph*)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Preparo de amostras para análise de fármacos em fluidos biológicos	13
1.2	Microextração por dispositivo preenchido com sorvente (MEPS)	16
1.2.1	Descrição da técnica	16
1.2.2	Tipos de sorventes e mecanismos de extração	18
1.2.3	MEPS em bioanálises	19
1.3	Análise de fármacos em fluidos biológicos	19
1.4	Estatinas	20
2	OBJETIVOS	23
2.1	Objetivos gerais	23
2.2	Objetivos específicos	23
3	MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1	Reagentes e padrões	24
3.2	Amostras analisadas	24
3.3	Materiais	24
3.4	Instrumentação	25
3.5	Métodos	25
3.5.1	Preparo dos padrões analíticos	25
3.5.2	Preparo das amostras em plasma	25
3.5.3	Condições cromatográficas para otimização do método	26
3.5.4	Avaliação de diferentes fases extratoras	26
3.5.5	Avaliação dos solventes de limpeza e eluição	27
3.5.5.1	Teste de eluição contínuo	27
3.5.5.2	Teste de eluição completo	28
3.5.6	Otimização das condições de extração por MEPS	29
3.5.6.1	Otimização da etapa de amostragem	29
3.5.6.2	Otimização da etapa de eluição	32
3.5.7	Método de extração desenvolvido/otimizado	33
3.5.8	Condições cromatográficas utilizadas na validação	34
3.5.9	Validação	35
3.5.9.1	Seletividade	35
3.5.9.2	Linearidade	35

3.5.9.3	Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ).....	36
3.5.9.4	Precisão e Exatidão	36
3.5.9.5	Recuperação.....	36
3.5.9.6	Robustez.....	37
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1	Desenvolvimento do método de extração	39
4.1.1	Separação cromatográfica para o LC-MS/MS (QqTof)	39
4.1.2	Avaliação de diferentes fases extratoras	39
4.1.3	Avaliação dos solventes de limpeza e eluição	40
4.1.3.1	Teste de eluição contínuo	40
4.1.3.2	Teste de eluição completo	42
4.1.4	Otimização da etapa de amostragem	44
4.1.5	Otimização da etapa de eluição	50
4.2	Validação do método	51
4.2.1	Seletividade.....	51
4.2.2	Linearidade, limite de detecção e limite de quantificação	52
4.2.3	Precisão e Exatidão	54
4.2.4	Recuperação.....	56
4.2.5	Reprodutibilidade intralaboratorial e robustez	57
5	CONCLUSÃO	60
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS)¹, as doenças cardiovasculares são as principais causas de mortes no mundo. No Brasil, atualmente, 44% da população possui colesterol alto e essas pessoas encontram-se na faixa de risco para as doenças cardiovasculares.² Desta forma, fica evidente a urgência em se encontrar meios de diminuir o número de óbitos causados por essas doenças.

A diminuição dos níveis de colesterol plasmático é um bom passo para a prevenção de doenças cardiovasculares. Medicamentos reguladores do colesterol inibem a ação de uma enzima que atua na biossíntese do colesterol. Dentre eles as estatinas são os fármacos mais potentes, seguros e eficazes.³ Embora eficazes, doses inadequadas dos fármacos podem causar efeitos colaterais tóxicos em alguns pacientes. Nesses casos, para controlar precisamente a dose de forma a causar o menor efeito colateral possível, é necessário realizar uma monitorização terapêutica.

Na monitorização terapêutica, a concentração do fármaco no plasma é quantificada por meio de métodos analíticos. É desejado que as técnicas para preparo da amostra sejam rápidas, pré-concentrem a amostra e trabalhem com volumes baixos de amostra e solventes. Visando atender a esses requisitos, têm surgido nos últimos anos novas técnicas de preparo de amostra, sendo que algumas dessas serão apresentadas nas seções seguintes.

1.1 Preparo de amostras para análise de fármacos em fluidos biológicos

Um processo analítico abrange pelo menos as seguintes etapas: amostragem, preparo de amostra, separação, detecção e análise de dados. Dentre essas, o preparo de amostras é a etapa mais demorada, na qual cerca de 80% do tempo de análise é consumido.⁴ Além disso, é uma das principais fontes de erros nas análises, visto que envolve várias etapas de manipulação da amostra. Um bom preparo de amostras leva à remoção dos interferentes e concentração dos analitos, permitindo a obtenção de separação cromatográfica dos componentes de interesse com detecção adequada e um tempo razoável de análise.⁵

Em análises farmacêuticas, amostras de matrizes complexas, como plasma e urina, apresentam proteínas e outros interferentes que podem prejudicar a análise. As proteínas podem causar entupimento dos *frits* e injetores, embora alguns sistemas sejam desenvolvidos para superar tal problema. Assim, o desenvolvimento do preparo de amostra desempenha um importante papel em análises farmacêuticas e tem como objetivo final a concentração e isolamento do analito de matrizes complexas para posterior injeção no instrumento cromatográfico.⁶

Há uma grande variedade de técnicas como extração líquido-líquido (LLE), extração em fase sólida (SPE), extração por fluido supercrítico (SFE), microextração em fase sólida (SPME), microextração em fase líquida (LPME), que são usadas atualmente em análises farmacêuticas.^{6; 7; 8} Essas técnicas podem ser classificadas de acordo com as características do solvente empregado (Figura 1).

Apesar de ser atualmente considerada como uma técnica clássica, a extração líquido-líquido (LLE) ainda tem sido muito utilizada em bioanálises.⁸ Ela produz extratos bastante limpos e que podem fornecer alta seletividade para análise de alguns analitos. A técnica tem como principais vantagens a simplicidade e a possibilidade de utilização de um grande número de solventes puros e disponíveis comercialmente. Entretanto é de difícil automação, pois geralmente utiliza grandes volumes de solventes tóxicos, sendo necessária uma posterior etapa demorada de secagem.^{5; 8; 9}

Figura 1. Classificação das técnicas de extração de acordo com a natureza do solvente empregado. Adaptado de: LANÇAS, F. M. **Cromatografia líquida moderna - HPLC/CLAE**. Campinas: Editora Átomo, 2009. 313 p.

As técnicas que empregam fluidos pressurizados (SFE, ASE, e sub-SFE) têm sido uma alternativa viável em comparação a LLE, pois em geral evitam o uso de elevadas quantidades de solventes orgânicos. Na extração acelerada com solventes (ASE), o uso do solvente é significativamente minimizado, na extração com fluido supercrítico (SFE), emprega-se CO₂ como solvente e, na extração com fluido subcrítico (sub-SFE), emprega-se usualmente água. No entanto, as aplicações dessas técnicas para análise de fluidos biológicos não são muito comuns.^{10; 11; 12; 13}

As duas principais técnicas de extração líquido-sólido são: extração Soxhlet e a extração em fase sólida (SPE). Essa última foi introduzida inicialmente como uma miniaturização da cromatografia líquida clássica empregando uma coluna aberta, denominada cartucho de extração. A SPE convencional apresenta algumas vantagens em relação à extração líquido-líquido como: menor consumo de solvente orgânico, não formação de emulsões, alta recuperação, razões de concentração mais efetivas, fácil operação, tempo de preparo mais curto e fácil automação. Tal técnica apresenta algumas limitações como custos elevados dos dispositivos comerciais para extração em paralelo (*manifolds*) e dos cartuchos que são geralmente utilizados uma única vez. Apesar disso, a SPE tem sido muito utilizada atualmente para análise de fármacos em matrizes biológicas.^{9; 14; 15; 16}

Com a necessidade de diminuir o uso de solventes e fases extratoras, surgiram técnicas miniaturizadas para o preparo de amostras. As principais técnicas miniaturizadas são: a microextração em fase líquida (LPME), a microextração em fase sólida (SPME) a extração por sorção em barras de agitação (SBSE), e a microextração por dispositivo preenchido com sorvente (MEPS). A maioria dessas técnicas, além do uso reduzido de volume de solventes e fase extratora, apresenta como vantagem: menor consumo de amostra, facilidade de operação e facilidade para automação. O acoplamento on-line dessas técnicas a sistemas de análise podem resultar em maior sensibilidade, rapidez nas análises, redução de perdas de analitos e erros durante o processo de extração.¹⁷

Em trabalho publicado por Abdel-Rehim¹⁸, algumas características foram destacadas e comparadas para as técnicas MEPS, SPE e SPME (Tabela 1).

Na Tabela 1 é possível observar que a técnica MEPS trabalha com os menores volumes de sorvente e em menor tempo. A MEPS também trabalha com volumes

reduzidos de amostras e de solvente, da ordem de 10-1000 µL. Dessa maneira, essa é uma técnica rápida, simples, ambientalmente correta e apropriada para o preparo de amostras biológicas realizado neste trabalho.^{19; 20}

Tabela 1: Comparação entre características das técnicas MEPS, SPME e SPE.

Fator	MEPS	SPE convensional	SPME
Quantidade de sorvente	0,5-4 mg	50-2000 mg	Espessura150 mm
Tempo para preparo da amostra	1-2 min	10-15 min	10-40 min
Reutilização	40-100 extrações	descartável	50-70 extrações
Recuperação	Boa	Boa	Baixa

Adaptado de: LANCAS, F. M. **Cromatografia líquida moderna - HPLC/CLAE**. Campinas: Editora Átomo, 2009. 313 p.

1.2 Microextração por dispositivo preenchido com sorvente (MEPS)

1.2.1 Descrição da técnica

A microextração por dispositivo preenchido com sorvente, MEPS (*Microextraction by Packed Sorbent*) é uma técnica de preparo de amostras relativamente nova, na qual se emprega uma seringa com agulha contendo um pequeno cartucho com o sorvente (Figura 2).²¹

Figura 2. A) Foto de uma seringa de MEPS B) Figura esquemática do dispositivo de extração acoplado à agulha do sistema para MEPS.
Adaptado de: ABDEL-REHIM, M.; ALTUN, Z.; BLOMBERG, L. Microextraction in packed syringe (MEPS) for liquid and gas chromatographic applications. Part II—Determination of ropivacaine and its

metabolites in human plasma samples using MEPS with liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 39, n. 12, p. 1488-1493, 2004.

É considerada como uma versão miniaturizada da SPE, já que ambas empregam as mesmas etapas de separação e fases extratoras. Na técnica MEPS, diferentemente da SPE, a fase sólida é diretamente inserida na agulha, não em um cartucho separado.

De forma geral, o dispositivo de MEPS é operado de acordo com as etapas descritas a seguir. A fase estacionária é condicionada aspirando-se e dispensando-se os solventes apropriados. A amostra é então aspirada para interagir com o sorvente e em seguida dispensada. Esse processo de aspirar/dispensar (ciclo) pode ser repetido várias vezes para aumentar a eficiência da extração. Em seguida, a fase estacionária é lavada para eliminar interferentes da matriz. A eluição do analito é feita usando um solvente apropriado; este é aspirado, e posteriormente, é diretamente injetado no sistema cromatográfico, ou coletado em um frasco adequado. A fase estacionária passa por uma etapa de limpeza com solvente orgânico e solução de lavagem, ficando assim preparada para a amostra seguinte.²² A Figura 3 apresenta graficamente as etapas descritas acima.

Figura 3. Esquema de utilização do sistema de MEPS.

Adaptado de: ABDEL-REHIM, M.; ALTUN, Z.; BLOMBERG, L. Microextraction in packed syringe (MEPS) for liquid and gas chromatographic applications. Part II—Determination of ropivacaine and its metabolites in human plasma samples using MEPS with liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 39, n. 12, p. 1488-1493, 2004.

1.2.2 Tipos de sorventes e mecanismos de extração

Como é considerada uma miniaturização da SPE, a técnica MEPS também pode usar os mesmos tipos de sorventes. Uma vez que as fases sólidas empregadas em MEPS são similares às aquelas empregadas em SPE e cromatografia líquida em colunas, os mecanismos de separação também são os mesmos.

O mecanismo de separação envolvido com o uso de sílica como sorvente é o da adsorção, no qual a retenção de um soluto é determinada pelo balanço entre as interações deste com a fase móvel e sua competição com as moléculas da fase móvel pelos sítios de adsorção presentes na superfície da fase estacionária. A sílica é usualmente utilizada em processos de separação de analitos polares, processo no qual ocorre adsorção dos analitos na superfície que contém grupos silanóis, por meio de ligações de hidrogênio.^{23; 24}

Para evitar a adsorção irreversível entre analitos polares e a fase estacionária polar (ex. sílica e alumina) foram desenvolvidas fases estacionárias que apresentam mecanismos de partição. Nessas fases, denominadas quimicamente ligadas ou *bonded phases*, grupos alquílicos e outros (R) estão ligados à estrutura básica da sílica. Se o grupo R for polar, e.g. R = OH, CN, NH₂, a fase é denominada *normal*. Na extração em fase normal, a amostra é diluída em um solvente pouco polar, sendo que, ao ser injetada, os analitos ficam retidos na fase estacionária. Em seguida um solvente mais polar é aplicado para romper as interações do analito com a fase estacionária, fazendo com que eles sejam eluídos.

Quando o grupo R ligado à sílica for apolar (por exemplo, R = C₁₈, C₈, C₂), a fase estacionária é denominada *reversa* e a fase móvel é constituída por uma mistura de solventes polares. As fases mais utilizadas em MEPS são as de sílica modificada (C18 e C8) e aquelas em modo misto (C8-SCX). Nesse modo, as fases C8 e de troca iônica colocada no dispositivo de extração interagem com o analito por meio de um mecanismo de fase reversa (C8) e por interações eletrostáticas com o grupo sulfônico do trocador iônico (SCX). Isso permite que a seletividade obtida seja diferente daquela obtida com o uso individual das fases.

As fases de troca iônica, embora não muito comumente, também podem ser usadas nas aplicações em MEPS separadamente para isolamento de analitos com caráter ácido ou básico. Nelas ocorre a atração entre o analito e o trocador de íons

de carga oposta, ou seja, durante a extração os contra-íons ligados à fase são deslocados pelo analito na forma iônica. Este se adere à parte iônica restante na fase sólida. Compostos básicos são retidos em um trocador forte de cátions (ácido sulfônico, $[\text{SO}_3^-]$), enquanto compostos ácidos ficam retidos por trocadores fortes de ânions (amina quaternária, $[\text{N}^+(\text{CH}_3)_3]$).

Dentre os tipos de sorventes descritos acima, os de sílica modificada são os mais utilizados em MEPS. Outras fases também utilizadas são polímeros de poliestireno^{22; 25; 26; 27; 28} e polímeros molecularmente impressos (MIP)^{29; 30}. Esse último é um polímero quimicamente moldado a partir de uma molécula modelo. Esse polímero contém sítios específicos para reconhecimento das moléculas de interesse.^{31; 32}

1.2.3 MEPS em bioanálises

A técnica MEPS tem sido usada na extração de uma vasta faixa de analitos em amostras biológicas como sangue, plasma e urina. Dentre esses analitos estão vários medicamentos como antidepressivos^{33; 34; 35}, imunossupressores³⁶, anestésicos locais e seus metabólitos^{37; 38; 39; 40}, anti-tumorais^{25; 26; 27}, hormônios esteroides^{41; 42; 43}, antibióticos^{29; 44} e agentes hipolipemiantes^{45; 46}.

Considerando-se as características apresentadas nas Seções 1.2.1, 1.2.2 e 1.2.3, podemos apontar a MEPS como uma atraente alternativa na análise de fármacos em fluidos biológicos.

1.3 Análise de fármacos em fluidos biológicos

A análise de fármacos em amostras biológicas é de grande importância para o desenvolvimento de compostos mais seletivos e efetivos. O conhecimento dos níveis de fármacos nos fluidos biológicos fornece informações para estudos de farmacocinética, biodisponibilidade e interações medicamentosas. Tais informações são utilizadas para assegurar a eficácia terapêutica e minimizar os efeitos adversos dos fármacos desenvolvidos ou prescritos quando realizada a monitorização terapêutica.^{6; 47}

A resposta terapêutica está relacionada com a dosagem e a concentração do fármaco na corrente sanguínea.⁴⁸ Dentro de uma faixa de concentração chamada faixa terapêutica o medicamento exerce o efeito desejado, abaixo dessa faixa o efeito será subterapêutico enquanto que acima dessa faixa o risco de intoxicação é maior. Assim a monitorização terapêutica do fármaco na corrente sanguínea se faz necessária para medicamentos com faixas terapêuticas mais estreitas, quando há chance de superdosagem ou subdosagem.⁸

A monitorização terapêutica (TDM) é necessária também para monitoramento de medicamentos com variabilidade farmacocinética, medicamentos cujas concentrações são difíceis de monitorar e medicamentos conhecidos por causar efeitos adversos. Para tais casos a monitorização terapêutica proporcionará dosagens mais ajustadas aos pacientes permitindo alcançar efetivamente os efeitos terapêuticos e minimizando os efeitos adversos.⁴⁸ O conhecimento acerca do comportamento terapêutico das estatinas pode ser relevante, sendo essa classe de fármacos objeto do presente estudo.

1.4 Estatinas

As elevadas taxas de colesterol plasmático representam um grande risco para o desenvolvimento de doenças coronárias.⁴⁹ Para prevenir tais doenças cardiovasculares de alto índice de mortalidade é fundamental que se realize o controle plasmático do colesterol ligado a lipoproteínas de baixa densidade (LDL). Dessa forma, tem se buscado, desde 1950, fármacos capazes de realizar esse controle como, por exemplo, as estatinas (Figura 4).⁵⁰

As estatinas são fármacos utilizados no tratamento da dislipidemia, a qual consiste de um distúrbio na síntese e degradação de lipoproteínas plasmáticas causando a elevação da concentração de lipídios no plasma. Tais medicamentos interferem na biossíntese do colesterol inibindo a 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMG-CoA redutase) e reduzindo assim os níveis de LDL plasmático⁴⁹. O efeito inibidor das estatinas bloqueia a conversão do substrato HGM-CoA a ácido mevalonico e consequentemente inibindo a produção do colesterol (Figura 5).^{51 52}

Dentre os medicamentos redutores do LDL, as estatinas são as mais eficazes, toleráveis e as mais utilizadas. Apesar de não serem frequentes, podem

ser observados efeitos adversos como toxicidade hepática e/ou muscular em graus variados, e o mais grave, a rabdomiólise, síndrome caracterizada por necrose muscular.⁵³ A incidência dessa síndrome pode ser aumentada quando as estatinas são utilizadas concomitantemente com fármacos que competem com as mesmas vias metabólicas.

Figura 4. Fórmula estrutural das estatinas mais comuns

Figura 5. Síntese do colesterol inibida pela ação das estatinas que inibem a HMG-CoA reductase.

Adaptado de: SCHACHTER, M. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 19, n. 1, p. 117-125, 2005.

Em casos, nos quais o medicamento apresenta toxicidade para o paciente, a monitorização terapêutica, pode ser indicada. Combinando os conhecimentos dos dados farmacocinéticos e farmacodinâmicos dos medicamentos, a TDM permite a avaliação da eficácia e segurança de um medicamento específico em uma variedade de parâmetros clínicos. O objetivo desse processo é individualizar as dosagens para ótimo benefício ao paciente.⁵⁴

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Desenvolvimento, otimização e validação de um método analítico para análise de estatinas em plasma humano por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial, utilizando MEPS na etapa de preparo de amostra.

2.2 Objetivos específicos

- ❖ Desenvolver um método para análise de estatinas em plasma humano empregando MEPS como preparo de amostra e LC-MS/MS
- ❖ Avaliação univariada de diferentes fases extratoras.
- ❖ Avaliação univariada da composição do solvente de lavagem e de eluição.
- ❖ Otimização multivariada da etapa de amostragem e etapa de eluição.
- ❖ Validação do método avaliando parâmetros como seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e recuperação.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes e padrões

Os padrões analíticos tais como atorvastatina cálcica (AT), sinvastatina (SV), e pravastatina sódica (PRA) foram adquiridos da USP Rockville MD e o padrão de fluvastatina (FLV) da Cayman Chemical Company. O padrão analítico rosuvastatina (ROS) foi gentilmente doado pelo professor Dr. Anil Kumar Singh da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF- USP).

Utilizou-se ácido fórmico para espectroscopia a 98% de pureza (Fluka Analytical), hidróxido de amônio (Chemis), metanol grau HPLC (Tedia) e acetonitrila grau HPLC (Tedia). Todos os solventes e reagentes usados possuíam grau HPLC ou analítico. A água utilizada para preparar todas as amostras e soluções foi purificada em sistema Milli-Q da Millipore.

3.2 Amostras analisadas

As amostras de plasma branco, livres de estatinas e sorologicamente negativas para hepatite B e C, HIV e sífilis, foram cedidas pela Casa de Saúde de São Carlos sendo mantidas congeladas no freezer a -20 °C.

3.3 Materiais

- ❖ Seringa MEPS de 250 µL com agulha removível (SGE)
- ❖ Agulhas contendo microdispositivos (*BIN – barrel insert and needle*) preenchidos com C18, C8, e C8+SCX (SGE)
- ❖ Dispositivos para MEPS *home-made* acoplado a uma seringa Hamilton de 250 µL
- ❖ Fase extratora C18 (Chromabond) e HLB (Oasis)
- ❖ Membranas de filtração de Politetrafluoretileno, PTFE (0,22 µm)
- ❖ Frascos de fundo cônico
- ❖ Tubos tipo *Eppendorf* de 500 µL, 1,5 mL e 2 mL

3.4 Instrumentação

- ❖ Balança analítica modelo AG285 (Mettler Toledo)
- ❖ pHmetro modelo B-374 (Micronal)
- ❖ Banho de água termostatizado (Quimis)
- ❖ Lavadora ultra-sônica Ultra Cleeaner (Unique)
- ❖ Centrifuga LS-3 Plus (Celm)
- ❖ Centrifuga MiniSpin plus (Eppendorff)
- ❖ Balões volumétricos de 5, 10 e 25 mL (Pyrex)
- ❖ HPLC série Prominence 20 AD (Shimadzu) acoplado a um espectrômetro de massas híbrido, modelo micrOTOF-Q II (Bruker Daltonics)
- ❖ UPLC Acquity (Waters) acoplado a um espectrômetro de massas triplo quadrupolo, Xevo TQMS (Waters).

3.5 Métodos

3.5.1 Preparo dos padrões analíticos

Foram preparadas soluções estoque de fluvastatina, sinvastatina, atorvastatina, rosuvastatina e pravastatina em acetonitrila:água (80:20, v/v) na concentração de 200 mg L⁻¹ e mantidas sob refrigeração a 4 °C. A rosuvastatina foi utilizada como padrão interno na validação dos métodos. Tais soluções foram diluídas em soluções de trabalho para fortificação das amostras de plasma durante o desenvolvimento do preparo da amostra e do método cromatográfico.

3.5.2 Preparo das amostras em plasma

Nos testes iniciais para avaliação da interação das fases extratoras com os analitos, utilizou-se água deionizada no lugar da matriz para facilitar o desenvolvimento do método, já que não seria necessário realizar a etapa de limpeza, a qual seria avaliada posteriormente.

Para a otimização do método, as etapas de limpeza, amostragem e eluição foram avaliadas utilizando-se amostras de plasma humano branco. Essas amostras

foram centrifugadas a 3400 rpm durante 20 minutos, filtradas com membrana PTFE de 0,22 μm , estocadas em frascos e armazenadas no freezer a -20 °C.

Para obter-se a concentração desejada, alíquotas das soluções de trabalho contendo os analitos foram transferidas para tubos *ependorf* limpos, secas sob fluxo de nitrogênio e resuspensas em plasma branco:água (1:4, v/v). A diluição do plasma se faz necessária para evitar a obstrução dos *frits* das microcolunas durante as extrações.

3.5.3 Condições cromatográficas para otimização do método

Durante o desenvolvimento do método a separação cromatográfica das estatinas foi realizada por LC-ESI-TOFMS. As análises cromatográficas foram realizadas utilizando um sistema HPLC 20A da Shimadzu equipado com coluna Kinetex XB-C18 (100 mm x 2,1 mm x 2,6 μm) em modo isocrático de eluição com fase móvel composta por acetonitrila:tampão formiato de amônio 5 mM pH = 4,5 (50:50, v/v), a uma vazão de 0,25 mL min⁻¹ e tempo de análise de 18 minutos. Utilizou-se um espectrômetro de massas híbrido (QqTOF), Bruker, modelo micrOTOF-Q II, funcionando no modo *full* MS. Dependendo do analito, a fonte de *electrospray* operou nos modos negativo ou positivo de ionização. Os parâmetros utilizados foram os seguintes:

- Íons monitorados no modo positivo (m/z): 419,27 (SV), 559,26 (AT) e 412,19 (FLV);
- Íon monitorado no modo negativo (m/z): 423,23 (PRA);
- Voltagem do capilar: 4,5 kV (modo positivo) e 4,0 kV (modo negativo);
- Pressão do Nebulizador: 4 bar;
- Vazão do gás secante: 8 L min⁻¹;
- Temperatura da fonte: 200 °C;

3.5.4 Avaliação de diferentes fases extratoras

Inicialmente foram avaliadas diferentes fases extratoras para seleção daquelas que apresentassem melhor interação com os analitos. Os sorventes C18, C8 e C8+SCX foram testadas nos dispositivos de MEPS comercial e as fases C18

(Chromabond) e HLB (Oasis) foram utilizadas nos dispositivos *home-made*. As mesmas etapas de extração foram executadas para ambos os dispositivos. O sorvente foi condicionado aspirando-se e dispensando-se 250 µL de metanol e em seguida 250 µL de tampão formiato de amônio 5 mM em pH = 4,5. Na etapa da amostragem, 100 µL de solução contendo 1 mg L⁻¹ de SV, AT, PRA e FLV foram aspirados e dispensados quatro vezes (04 ciclos). A eluição/dessorção foi realizada também em quatro ciclos (aspirar/dispensar) com 200 µL de uma solução acetonitrila:formiato de amônio, 5 mM em pH = 4,5 (95:05, v/v). A fim de se garantir uma dessorção máxima dos analitos, utilizou-se uma maior porcentagem do solvente orgânico. A presença do tampão faz-se necessária para que os analitos mantivessem sua forma ácida. As extrações foram feitas em triplicata.

3.5.5 Avaliação dos solventes de limpeza e eluição

3.5.5.1 Teste de eluição contínuo

Inicialmente foi realizado um teste de eluição contínua, na qual, após a etapa de amostragem, a fase extratora passou pelo processo de dessorção consecutivamente com soluções de tampão e solvente orgânico em diferentes porcentagens, ou seja, a etapa de amostragem foi realizada apenas uma vez (Figura 6).

Após o condicionamento da fase extratora com 200 µL de acetonitrila (ACN) e 200 µL de tampão formiato de amônio 5 mM pH = 4,5, 100 µL de plasma:água (1:4, v/v) fortificado na concentração de 500 ng mL⁻¹ (SV, AT, PRA e FLV) foi aspirado/dispensado em quatro ciclos. A eluição foi realizada em 11 etapas, sendo a primeira com apenas tampão, a segunda com solução ACN:tampão (10:90, v/v), a terceira ACN:tampão (20:80, v/v) e assim por diante até a última solução correspondente a apenas acetonitrila. Em cada etapa foram realizados 4 ciclos (aspirar/dispensar) com 100 µL de solução. O extrato de cada etapa foi acondicionado em um frasco de fundo cônico e adicionaram-se 10 µL de ACN ao eluato antes da injeção no cromatógrafo.

Figura 6. Esquema do experimento de eluição contínua. Apenas uma extração foi realizada.

Para o cálculo da recuperação o mesmo procedimento foi realizado apenas com plasma diluído (branco). O extrato foi fortificado adicionando-se 10 μL de uma solução trabalho de estatina para que a concentração fosse de 500 ng mL^{-1} . As fases extratoras utilizadas nesses experimentos foram HLB e C18 Chromabond. Metanol também foi testado com solvente orgânico.

3.5.5.2 Teste de eluição completo

Posteriormente foi realizado um teste de eluição completo no qual são realizadas 9 extrações diferentes, todas realizadas com as mesmas etapas de condicionamento, amostragem e lavagem, diferindo apenas a composição da solução de eluição. Em outras palavras, após a eluição a fase extratora foi recondicionada e passou pelas etapas de condicionamento, amostragem e lavagem novamente para ser eluída com uma solução de composição diferente.

Nesse experimento o condicionamento foi realizado com 4 ciclos de 200 μL de metanol e 4 ciclos com 200 μL de água. A amostragem também foi realizada em 4 ciclos de 100 μL de plasma: água (1:4, v/v) fortificado com 500 ng mL^{-1} de estatinas. Na etapa de lavagem o sorvente é lavado em 4 ciclos com 200 μL de água e em seguida é lavado mais uma vez com uma nova alíquota de água de 200 μL . A

eluição é realizada em uma única etapa em 4 ciclos de 100 μL de solvente. Após a eluição, o sorvente passou por um recondicionamento com 4 ciclos de 200 μL de metanol e 4 ciclos com 200 μL de água e uma nova extração foi iniciada. Os extratos foram acondicionados em frascos de fundo cônico e adicionaram-se 10 μL de ACN antes da injeção no cromatógrafo. A cada 15 extrações, a microcoluna foi desmontada e lavada. Os *frits*, depois de lavados, foram reaproveitados e mostraram ter uma vida útil de aproximadamente 30 extrações.

A Figura 7 apresenta em forma esquematizada o teste de eluição completo.

Figura 7. Esquema do teste de eluição completo, no qual foram realizadas 9 extrações. X refere-se à proporção tampão:acetonitrila utilizada nos experimentos (90:10; 80:20; 70:30; 60:40; 50:50; 40:60; 30:70; 20:80 e 10:90, v/v) .

Para o cálculo da recuperação o mesmo procedimento foi realizado apenas com plasma diluído (branco). O extrato foi fortificado adicionando-se 10 μL de uma solução trabalho de estatina para que a concentração fosse de 500 ng mL^{-1} . As fases extratoras utilizadas nesses experimentos foram HLB e C18 Chromabond. Metanol também foi avaliado como solvente orgânico.

3.5.6 Otimização das condições de extração por MEPS

Dentre as possíveis variáveis que podem influenciar o desempenho do MEPS na extração, as etapas de amostragem e eluição foram selecionadas para otimização. As etapas foram avaliadas em planejamentos fatoriais separados, visto que não há dependência entre as duas.

3.5.6.1 Otimização da etapa de amostragem

Inicialmente, um planejamento fatorial completo (2^2) foi empregado variando-se o volume de amostra (100-200 μL) e o número de ciclos de amostragem (4-8). A

Tabela 2 apresenta os níveis de cada variável e a forma como os ensaios foram realizados.

Tabela 2. Planejamento fatorial completo (2^2) utilizado na otimização da etapa de amostragem

Variáveis	Nível Baixo (-)	Ponto Central (0)	Nível Alto (+)
Volume de Amostra (μL)	100	150	200
Nº de ciclos	4	6	8

Ensaio	Volume de Amostra	Nº de ciclos
1	-	-
2	+	-
3	-	+
4	+	+
5	0	0
6	0	0
7	0	0

A partir dos pontos que apresentaram melhor resposta no planejamento anterior, outro planejamento fatorial completo (2^2) foi empregado variando-se o volume de amostra (150-250 μL) e número de ciclos de amostragem (6-10). A Tabela 3 apresenta os níveis de cada variável e a forma como os ensaios foram realizados.

Tabela 3. Planejamento fatorial completo (2^2) utilizando valores mais altos para os níveis de cada variável seguindo resultados obtidos no planejamento anterior.

Variáveis	Nível Baixo (-)	Ponto Central (0)	Nível Alto (+)
Volume de Amostra (μL)	150	200	250
Nº de ciclos	6	8	10

Ensaio	Volume de Amostra	Nº de ciclos
1	-	-
2	+	-
3	-	+
4	+	+
5	0	0
6	0	0
7	0	0

Os planejamentos fatoriais utilizados na amostragem e eluição foram realizados com ponto central (valor médio) a fim de estimar o erro experimental sem a necessidade de replicata em cada ensaio. O software Statistica 7.0 foi utilizado para construção do modelo, o qual foi avaliado por ANOVA (Análise de variância).

Em ambos os planejamentos o condicionamento/recondicionamento foi realizado aspirando-se 250 μL de metanol por 4 vezes (4 ciclos) e em seguida 250 μL de água quatro vezes (4 ciclos). A amostragem foi realizada com amostra de plasma fortificada com 200 ng mL^{-1} de estatinas, segundo descrito nas Tabelas 2 e 3, a lavagem foi realizada com 4 ciclos de uma alíquota de 200 μL de água e em seguida aspirou-se uma nova alíquota de 200 μL de água. Por fim a eluição foi realizada em 4 ciclos com 100 μL de solução acetonitrila: tampão formiato de amônio 5 mM, pH = 4,5 (75:25, v/v).

Para avaliar os efeitos da temperatura de acondicionamento da amostra na recuperação dos analitos realizaram-se quatro experimentos diferentes. Nestes experimentos a concentração dos analitos, as etapas de condicionamento, amostragem e eluição foram as mesmas realizadas no experimento anterior. Apenas o número de ciclos de amostragem e temperatura foi alterado de acordo com a Tabela 4.

Tabela 4. Tabela com os experimentos realizados para avaliação da recuperação e efeito matriz.

Experimento	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Número de ciclos de amostragem
1	37	10
2	12	10
3	37	06
4	12	06

Os experimentos para recuperação e efeito matriz foram realizados de acordo com o método proposto por Matuszewski, Constanzer e Chavez-Eng⁵⁵. Para cada experimento fortificou-se 100 μL de solução de eluição, realizou-se uma extração com plasma branco fortificando-se o extrato obtido e realizou-se a extração de matriz previamente fortificada com os analitos (Figura 8).⁵⁶

As soluções (A) e os extratos (B) e (C) foram injetados no sistema cromatográfico e as áreas dos picos obtidos foram utilizadas para o cálculo da eficiência de extração (PE), efeito de matriz (ME) e recuperação (RE) de acordo com as Equações 1 e 2.

Figura 8. Esquema dos experimentos de recuperação e efeito matriz, onde (A) representa solução de eluição fortificada com 200 ng mL^{-1} de estatinas, (B) fortificação do extrato com 200 ng mL^{-1} de estatinas e (C) matriz fortificada com 200 ng mL^{-1} de estatinas antes de passar pelo processo de extração.

Adaptado de: TRUFELLI, H.; PALMA, P.; FAMIGLINI, G.; CAPPIELLO, A. An overview of matrix effects in liquid chromatography–mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 30, n. 3, p. 491-509, 2011.

$$\text{ME (\%)} = B/A \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

$$\text{RE (\%)} = C/B \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

$$\text{PE (\%)} = C/A \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Onde,

A = Área do pico da solução fortificada com os analitos

B = Área do pico do extrato pré-fortificado com os analitos

C = Área do pico do extrato pós-fortificado com os analitos

3.5.6.2 Otimização da etapa de eluição

Para a otimização da etapa de eluição, um planejamento fatorial completo (2^2) foi empregado variando-se as etapas de eluição (1-2) e número de ciclos de eluição (4-8). A Tabela 5 apresenta os níveis de cada varável e a forma como os ensaios foram realizados.

Tabela 5. Planejamento fatorial completo (2^2) utilizado para otimização da etapa de eluição.

Variáveis	Nível Baixo (-)	Nível Alto (+)
Nº de etapas	1	2
Nº de ciclos	4	8

Ensaio	Nº Etapas	Nº de ciclos
1	-	-
2	-	-
3	-	+
4	-	+
5	+	-
6	+	-
7	+	+
8	+	+

O software Statistica 7.0 foi utilizado para construção do modelo, o qual foi avaliado por ANOVA (Análise de variância). Os experimentos foram realizados seguindo os mesmos procedimentos de (re)condicionamento e lavagem do planejamento realizado na otimização da etapa de amostragem. A amostragem foi realizada em dez ciclos com 250 μL de plasma: água fortificado com 200 ng mL^{-1} de estatinas. A eluição foi realizada com 100 μL de solução ACN: tampão formiato de Amônio 5 mM, pH = 4,5 (75:25, v/v).

3.5.7 Método de extração desenvolvido/otimizado

No método desenvolvido, os experimentos foram conduzidos no modo *off-line* utilizando C18 Chromabond como sorvente de extração. O plasma fortificado foi incubado a 37 °C por 30 minutos antes de cada extração. O condicionamento foi realizado com 250 μL de metanol e 250 μL de água deionizada. A amostragem foi realizada em dez ciclos (aspirar/dispensar) de 250 μL de plasma em água (1:4). Para a remoção dos interferentes lavou-se o sorvente em quatro ciclos de 200 μL de água deionizada e mais um ciclo de 200 μL com nova alíquota de água deionizada. Os analitos foram eluídos em quatro ciclos de 100 μL de ACN: tampão formiato de amônio 5 mM pH 4,5 (75:25, v/v). Ao final da extração o sorvente foi recondicionado com 250 μL de metanol e 250 μL de água deionizada em quatro ciclos.

3.5.8 Condições cromatográficas utilizadas na validação

Durante a validação do método a separação cromatográfica das estatinas foi feita por LC-ESI-MS/MS. As análises em LC foram feitas utilizando um sistema UPLC Acquity (Waters) equipado com coluna Acquity UPLC BEH C18 (50 mm x 2,1 mm x 1,7 μ m) com gradiente de eluição (Figura 9) e acetonitrila e tampão formiato de amônio 5 mM pH = 4,5 como fase móvel, a uma vazão de 0,5 mL/min e tempo de análise de 4 minutos.

Figura 9. Gráfico com gradiente de eluição de acetonitrila e tampão formiato de amônio 5 mM pH= 4,5 como fase móvel, a uma vazão de 0,5 mL/min para análises realizadas em UPLC Acquity (Waters).

Utilizou-se um espectrômetro de massas triplo quadrupolo Xevo TQMS (Waters) no modo SRM e equipado com *electrospray*, operando nos modos negativo e positivo de ionização, dependendo do analito estudado. Os parâmetros utilizados foram os seguintes:

- Transições no modo positivo:
 - 419 $\rightarrow$ 199 e 419 $\rightarrow$ 285 (SV)
 - 559 $\rightarrow$ 292 e 559 $\rightarrow$ 440 (AT)
 - 412 $\rightarrow$ 224 e 412 $\rightarrow$ 266 (FLV)
 - 482 $\rightarrow$ 189 e 482 $\rightarrow$ 258 (ROS)
- Transições no modo negativo:
 - 423 $\rightarrow$ 303 e 423 $\rightarrow$ 321 (PRA)
- Voltagem do capilar: 2,5 kV;

- Temperatura de dessolvatação: 500 °C;
- Vazão de dessolvatação: 1000 L hora⁻¹;
- Vazão do gás do cone: 80 L hora⁻¹.

Como pode ser verificado, foram obtidas duas transições no modo SRM para cada analito estudado, sendo a de maior intensidade (em termos de área) para a quantificação do analito e a de menor intensidade para fins de identificação e confirmação da identidade do analito.

3.5.9 Validação

A validação do método foi realizada baseando-se nas recomendações da RE nº 899 da ANVISA.⁵⁷ Os parâmetros avaliados foram os seguintes: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de quantificação (LOQ), limite de detecção (LOD), recuperação e robustez.

Os ensaios foram realizados em ambiente com temperatura controlada evitando-se a luminosidade já que foi reportado anteriormente em estudos de estabilidade que a fluvastatina pode sofrer fotodegradação.^{58; 59; 60} A rosuvastatina foi utilizada com padrão interno na concentração de 180 ng mL⁻¹.

3.5.9.1 Seletividade

Para avaliação da seletividade do método foi utilizado *pool* de plasma contendo amostra de plasma branco de pelo menos 6 indivíduos. Para avaliação de presença de interferentes que pudessem eluir no mesmo tempo de retenção dos fármacos analisados, foram realizadas extrações em triplicata com alíquotas de plasma branco (plasma: água, 1:4, v/v).

3.5.9.2 Linearidade

As amostras de plasma foram fortificadas, passaram pelo processo de extração com o MEPS para posteriormente serem analisadas por LC-MS. A linearidade foi avaliada através das curvas analíticas construídas em seis níveis de concentração (Tabela 6). Os níveis correspondentes à concentração de 10, 20, 80, e

Tabela 6: Valores das concentrações utilizadas na avaliação da linearidade.

Compostos/replicata	Concentração (ng mL ⁻¹)					
PRA	20	30	80	120	160	200
ATO, SV e FLV	10	30	80	120	160	200
Número de replicas	2	5	2	5	5	2

200 ng mL⁻¹ foram feitos em duplicata, enquanto que os níveis de 30, 120 e 160 ng mL⁻¹ foram feitos em quintuplicata, totalizando n = 21 para cada fármaco analisado. Foi utilizado como padrão interno a rosuvastatina na concentração de 180 ng mL⁻¹.

Foram obtidas curvas analíticas para cada fármaco. Pela equação da reta ($y = ax + b$) foram obtidos os coeficientes angular (a) e linear (b). O coeficiente de correlação (r) e a equação linear de regressão foram calculados pelo método dos mínimos quadrados sem ponderação.

3.5.9.3 Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ)

O limite de detecção (LOD) foi estabelecido como sendo aquele em que ocorrem picos com altura equivalente a três vezes a amplitude da linha de base e o limite de quantificação (LOQ) como sendo aquele em que ocorrem picos com altura equivalente a no mínimo dez vezes a amplitude do ruído da linha de base na região do tempo de retenção de cada analito.

3.5.9.4 Precisão e Exatidão

A precisão intra-dia foi avaliada em quintuplicata em três níveis diferentes: 30 ng mL⁻¹ (baixo), 120 ng mL⁻¹ (médio) e 160 ng mL⁻¹ (alto) em dois dias consecutivos, e a precisão inter-dia foi avaliada com os resultados dos dois dias de coleta de dados. A precisão foi expressa como desvio padrão relativo (DPR%).

Os ensaios de exatidão intra e inter-dia foram realizados com os mesmos níveis de concentração e os resultados foram expressos em porcentagem de desvio.

3.5.9.5 Recuperação

A eficiência da extração foi avaliada pela recuperação nos níveis baixo, médio, e alto (30, 120 e 160 ng mL⁻¹). A recuperação foi calculada pela Equação 3.

$$R = \left[\left(\frac{A_{Apré}}{A_{ISpré}} \right) / \left(\frac{A_{Após}}{A_{ISpós}} \right) \right] \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Onde,

$A_{Apré}$ = Área do analito no extrato pré-fortificado

$A_{ISpré}$ = Área do padrão interno no extrato pré-fortificado

$A_{Após}$ = Área do analito no extrato pós-fortificado

$A_{ISpós}$ = Área do padrão interno no extrato pós-fortificado

3.5.9.6 Robustez

Para avaliação da robustez realizou-se um ensaio de reprodutibilidade intra-laboratorial em triplicata para a concentração de 120 ng mL⁻¹. Os ensaios foram realizados nas condições padrões do método, alterando-se a temperatura da sala onde foi realizada a extração e com diferentes analistas. Foram calculados os valores de precisão e exatidão para cada ensaio.

A robustez também foi avaliada por meio do teste de Youden^{61; 62}, no qual foi avaliada a influência de sete variáveis em dois níveis diferentes (Tabela 7). As letras maiúsculas (A-G) representam os valores nominais do método desenvolvido enquanto que as letras minúsculas (a-g) representam as variações estudadas. A combinação fatorial dos fatores e níveis gera oito experimentos, os quais foram realizados aleatoriamente e injetados em duplicata. Os resultados das análises são representados pelas letras de s a z.

Para calcular a influência da variação de cada parâmetro, calculou-se a diferença da média dos valores correspondentes às letras maiúsculas com a média dos valores referente às minúsculas por meio da Equação 2.

$$\begin{aligned} \text{Efeito } A/a = D_a &= \frac{s + t + u + v}{4} - \frac{w + x + y + z}{4} \\ \text{Efeito } B/b = D_b &= \frac{s + t + w + x}{4} - \frac{u + v + y + z}{4} \end{aligned} \quad \text{Equação 2}$$

Tabela 7: Fatores avaliados na robustez e matriz de Youden.

Fator	Valor (X/x)	Condição Experimental							
		1	2	3	4	5	6	7	8
% ACN na dessorção	A/a	A	A	A	A	a	a	a	a
	75/73								
Temperatura do banho	B/b	B	B	b	b	B	B	b	b
	37/39								
pH do tampão na dessorção	C/c	C	c	C	c	C	c	C	c
	4,5/4,2								
pH do tampão na fase móvel	D/d	D	D	d	d	d	d	D	D
	4,5/4,2								
Vazão da fase móvel (mL/min)	E/e	E	e	E	e	e	E	e	E
	5,0/4,8								
Temperatura do amostrador automático	F/f	F	f	f	F	F	f	f	F
	15/17								
Temperatura do forno	G/g	G	g	g	G	g	G	G	g
	40/38								
Resultados		s	t	u	v	w	x	y	z

Para avaliar se as modificações tem influência na robustez calculou-se o desvio padrão das diferenças (S_{Di}) por meio da Equação 3. Comparou-se esse valor com desvio padrão do método realizado em condições de reprodutibilidade intralaboratorial para avaliar se os conjuntos de fatores tiveram influência no resultado.

$$S_{Di} = \sqrt{2x \sum \left(\frac{D_i^2}{7} \right)} \quad \text{onde, } i = a - g \quad \text{Equação 3}$$

Segundo a Decisão da Comissão Europeia⁶², sempre que o S_{Di} for significativamente maior que o desvio padrão do método realizado em condições de reprodutibilidade intralaboratorial pode deduzir-se que o conjunto dos fatores tem influência no resultado. Tal afirmação é verdadeira, mesmo que cada fator isoladamente não influencie significativamente, e que o método seja suficientemente robusto ante as alterações escolhidas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Desenvolvimento do método de extração

4.1.1 Separação cromatográfica para o LC-MS/MS (QqTof)

A Figura 10 apresenta o cromatograma obtido pelo método cromatográfico utilizado durante a otimização do preparo da amostra.

Figura 10. Cromatograma do íon extraído no modo MS de solução padrão de estatinas (1 mg L^{-1}). (PRA) Pravastatina, (FLV) Fluvastatina, (AT) Atorvastatina, e (SV) Sinvastatina obtidos por LC-ESI-TOFMS. Condições de análise descritas no item 3.5.3.

A pravastatina, fluvastatina e atorvastatina eluem nos primeiros quatro minutos enquanto que a sinvastatina começa a eluir em 15 minutos de análise. Esse comportamento mostra uma afinidade maior entre a sinvastatina e a fase estacionária, em comparação com as outras estatinas.

4.1.2 Avaliação de diferentes fases extratoras

Diferentes fases extratoras foram avaliadas e comparadas quanto à eficiência de extração. A Figura 11 apresenta a comparação entre as fases de acordo com a eficiência da extração para cada analito.

Figura 11. Gráfico da eficiência de extração para cada estatina utilizando-se diferentes fases extratoras.

As fases MEPS C18 e C18 Chromabond foram as mais eficientes para a extração de pravastatina, atorvastatina e fluvastatina. No entanto a MEPS C18 apresentou menor eficiência na extração da sinvastatina. Já a fase HLB Oasis apresentou uma melhor eficiência de extração para a sinvastatina.

Em testes posteriores a fase MEPS C18 não se mostrou eficiente para extração de amostras reais de plasma, pois o *BIN* obstruía-se após 5 extrações sem ser possível recuperá-lo. Assim, dentre as três fases, foram selecionadas para avaliação dos solventes de limpeza e eluição apenas as fases C18 Chromabond e HLB Oasis, montadas em sistemas *home-made*.

4.1.3 Avaliação dos solventes de limpeza e eluição

4.1.3.1 Teste de eluição contínuo

Um teste de eluição contínuo foi aplicado para avaliar a melhor fase extratora e o melhor solvente orgânico para a extração dos analitos. A Figura 12 apresenta os gráficos de barras da recuperação em função da composição do solvente de eluição (porcentagem de solvente orgânico).

Figura 12. Gráficos de recuperação pela porcentagem de solvente orgânico obtidos no teste de eluição contínuo. As figuras A e B apresentam os gráficos correspondentes ao teste com a fase C18 Chromabond com acetonitrila e metanol respectivamente. As figuras C e D apresentam os gráficos correspondentes ao teste com a fase HLB Oasis com acetonitrila e metanol respectivamente.

Pela Figura 12 A e Figura 12 C observa-se que os analitos começaram a eluir a partir dos 20 % de acetonitrila e com 80% de acetonitrila todos os analitos foram eluídos. Já para eluição com o metanol (Figura 12 B e Figura 12 D) os analitos começaram a eluir com 25 % e 40% de metanol, respectivamente, e continuaram a eluir até que se chegasse a 100% de metanol na solução de eluição. Com base nesses resultados, a acetonitrila mostrou-se capaz de eluir os analitos de maneira mais eficiente e apresentou as melhores recuperações comparando-se com as extrações realizadas com metanol.

A Figura 13 apresenta os gráficos da recuperação em função da composição do solvente de eluição (porcentagem de solvente orgânico).

Figura 13. Gráficos de recuperação pela porcentagem de solvente orgânico obtidos no teste de eluição contínuo. (A) e (B): gráficos correspondentes ao teste com a fase C18 Chromabond com acetonitrila e metanol respectivamente. (C) e (D) gráficos correspondentes ao teste com a fase HLB Oasis com acetonitrila e metanol respectivamente.

Comparando-se as extrações realizadas com Chromabond C18 (Figura 13 A e 13 B) e HLB Oasis (Figura 13 C e Figura 13 D) como fases extratoras observou-se que as recuperações para a maioria dos analitos foram maiores nos testes com a primeira fase.

Com base nos bons resultados obtidos com a fase Chromabond C18 e acetonitrila como solvente orgânico na eluição dos analitos, essas variáveis foram selecionadas para a avaliação da eluição utilizando-se um teste completo.

4.1.3.2 Teste de eluição completo

Para selecionar a composição do solvente de lavagem e solvente de eluição realizou-se um teste de eluição completo. A Figura 14 apresenta os resultados deste

teste na forma de gráfico pela recuperação em função da composição do solvente de eluição.

Figura 14. Gráfico do teste de eluição completo utilizando C18 Chromabond como fase extratora e solvente de eluição composto de acetonitrila: tampão formiato de amônio (5 mM) em pH 4,5.

Observa-se pela Figura 14 que os analitos começam a eluir a partir de 10% de acetonitrila no solvente e a partir dos 75%, a recuperação é constante para todos os analitos. Com base nesse resultado, definiu-se a composição da solução de lavagem como sendo uma solução composta de tampão formiato de amônio 5mM em pH = 4,5 e a solução de eluição como sendo acetonitrila:tampão formiato de amônio 5mM em pH = 4,5 (75:25, v/v).

O tampão formiato de amônio 5mM em pH = 4,5 foi inicialmente selecionado como componente para solução de lavagem e de eluição. Essa escolha foi feita com base no fato das estatinas se interconverterem: aumentando-se o pH para 6 ou mais é favorecida a conversão da lactona para forma ácida ionizada; todavia abaixando o pH é favorecida a conversão do ácido para lactona e da lactona para ácido na forma não-ionizada. Assim, para evitar a interconversão das estatinas durante as extrações, o pH foi mantido sempre entre 4 e 5.⁶³

Nas extrações em que se utilizou tampão formiato de amônio 5 mM em pH = 4,5 na etapa de lavagem, os *BINs* começaram a perder a vida útil com alta frequência. Esse entupimento pode ser causado por uma obstrução dos poros dos *frits* pela precipitação de proteínas do plasma, como por exemplo a albumina, já que o pH da solução de lavagem (pH = 4,5) é próximo ao seu ponto isoelétrico

($pI = 4,7$).⁶⁴ Para resolver tal problema testaram-se extrações utilizando formiato de amônio 5 mM em $pH = 4,5$, formiato de amônio 5 mM em $pH = 7,2$ e água ultra pura na etapa de lavagem. A primeira solução de lavagem rendeu 5 extrações sem que o *BIN* entupisse, a segunda rendeu 10 extrações e a última 15 extrações. Para evitar o entupimento do *BIN* a solução de lavagem foi realizada com água ultra pura, no entanto, manteve-se o tampão formiato de amônio 5mM em $pH = 4,5$ na composição da solução de eluição para evitar a interconversão das estatinas.

4.1.4 Otimização da etapa de amostragem

A partir dos resultados obtidos no experimento de avaliação da etapa de amostragem, no qual se empregou um planejamento fatorial completo (2^2) (Tabela 2) foram construídos diagramas de Pareto, apresentados na Figura 15.

Figura 15. Diagramas de Pareto do planejamento fatorial completo 2^2 , no qual foram avaliados o volume de amostra (100-200 μL) e o número de ciclos aspirar/dispensar (4-8). A. Pravastatina; B. Atorvastatina, C. Fluvastatina e D. Sinvastatina.

Observa-se na Figura 15 que os fatores volume de amostra e número de ciclos de amostragem (aspirar/dispensar) são significativos para todos os analitos, visto que a linha pontilhada indica a região acima da qual os efeitos foram significativos com limite de confiança de 95%. A interação entre ambos os fatores também apresentou um efeito positivo na extração para todos os analitos avaliados (sendo significativa em três deles). O aumento do volume da amostra bem como o aumento do número de ciclos de amostragem resulta em um aumento na extração e concentração dos analitos.

As superfícies de resposta obtidas para cada analito apresentaram comportamento muito semelhante, podendo então ser avaliadas pela superfície de resposta global (Figura 16).

Figura 16. Gráfico de superfície de resposta obtido pelo planejamento 2^2 com ponto central para pravastatina, fluvastatina, atorvastatina e sinvastatina.

Pelo gráfico da Figura 16, observa-se que o volume de amostra de 200 μL e número de ciclos igual a 8 apresentaram a melhor resposta. O resultado também sugere que com volumes de amostras e número de ciclos ainda maiores também seria possível encontrar bons resultados. Por este motivo realizou-se outro planejamento fatorial completo 2^2 com ponto central utilizando-se faixas de valores

maiores para cada fator (Tabela 3). Os gráficos de Pareto obtidos nesse planejamento experimental são apresentados na Figura 17.

Figura 17. Diagramas de Pareto do planejamento fatorial completo 2^2 , no qual foram avaliados o volume de amostra (150-250 μ L) e o número de ciclos aspirar/dispensar (6-10). A. Pravastatina; B. Atorvastatina, C. Fluvastatina e D. Sinvastatina.

De acordo com a Figura 17, o fator volume de amostra mostrou-se significativo e apresentou efeito positivo na extração de todos os analitos. Apenas para a extração da fluvastatina o fator número de ciclos foi significativo e apresentou efeito positivo (Figura 15 B).

As superfícies de resposta obtidas para pravastatina, atorvastatina e sinvastatina apresentaram comportamento muito semelhante e estão representadas pela Figura 16.

Figura 18. Gráfico de superfície de resposta obtido pelo planejamento 2^2 da etapa de eluição para a pravastatina, atorvastatina e sinvastatina.

As melhores respostas para área de pico correspondem a 6 ciclos de amostragem e volume de amostra de 250 μL (Figura 18). Tal comportamento não é observado para fluvastatina (Figura 19).

Figura 19. Gráfico de superfície de resposta obtido pelo planejamento 2^2 da etapa de amostragem para a fluvastatina

De acordo com a Figura 19, a fluvastatina apresentou melhor resposta quando a amostragem foi realizada em 10 ciclos e com 250 μL de amostra. O comportamento observado para a fluvastatina seguiu o esperado: quanto maior o número de ciclos maior seria a resposta. No entanto, para a maioria dos analitos o comportamento observado foi o contrário, quanto menor o número de ciclos, melhor a resposta.

Um fator que pode ter influenciando no resultado é o efeito matriz, ou seja, conforme aumentamos o número de ciclos, mais interferentes da matriz ficam retidos na fase extratora, mascarando assim o resultado. Outro fator poderia ser a temperatura de incubação/ligação proteica. A temperatura de equilíbrio da interação analito-proteína não foi atingida, pois as amostras permaneciam na geladeira até poucos minutos antes da extração. Nas extrações com alto número de ciclos, a amostra ficava mais tempo sujeita a temperatura ambiente, podendo causar um aumento na interação. Para verificar se o comportamento observado era provocado por esses fatores realizou-se um experimento no qual foram avaliados os efeitos da temperatura na recuperação dos analitos e o efeito matriz. A Tabela 8 apresenta as recuperações médias obtidas em extrações com diferentes números de ciclos e diferentes temperaturas de incubação.

Tabela 8: Avaliação da temperatura na extração dos analitos.

Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Número de ciclos de amostragem	Recuperação (%)			
		PRA	FLV	AT	SV
37	10	89,5	56,6	86,9	53,9
12	10	94	60,5	85,4	65,6
37	06	94,1	45,1	79,3	44,6
12	06	87,8	42,3	78,0	53,9

Os valores de recuperação obtidos foram próximos, portanto, para avaliar se os resultados obtidos na Tabela 8 diferem significativamente entre os experimentos foi aplicado um teste estatístico: Anova dois fatores (*Two-way Anova*) (Tabela 9).

O teste estatístico sugeriu que há diferença significativa entre as temperaturas apenas para a sinvastatina enquanto que o fator número de ciclos apresentou diferença significativa para a sinvastatina, fluvastatina e atorvastatina. A interação

Tabela 9: Teste Anova (dois fatores) para experimentos com número de ciclos de amostragem e temperatura de incubação diferentes.

Analitos		PRA	SV	FLV	AT
Tipo de variação	Temperatura	0,4	35,4	0,0	1,1
	Nº de ciclos	0,3	35,2	28,9	30,7
	Interação	13,1	0,5	1,5	0,0
F-crítico		5,318			
		P = 0,05, V ₁ = 1 e V ₂ = 8			

* Os valores destacados em negrito indicam diferença significativa.

entre os fatores temperatura e número de ciclos apresentou diferença significativa apenas para a pravastatina. Mantendo-se o número de ciclos em 10 a recuperação foi menor para a maioria das estatinas para a temperatura mais alta (37°C) (Tabela 8). Tal comportamento indica uma possível influência da temperatura nos experimentos realizados no planejamento experimental. Para números maiores de ciclos, a amostra ficou mais tempo à temperatura ambiente. O aumento da temperatura favoreceu a interação analito-proteína, diminuindo assim a recuperação.

Além da temperatura de incubação, avaliou-se também o efeito matriz para extrações com 10 e 6 ciclos de amostragem (Tabela 10).

Tabela 10: Avaliação do efeito matriz na extração dos analitos.

Número de ciclos de amostragem	Efeito Matriz (%)			
	PRA	FLV	AT	SV
10 ciclos	100,3	109,4	101,3	104,4
06 ciclos	101,8	106,3	100,2	100,6

Pela Tabela 10 observa-se que os valores próximos a 100% indicando que o efeito matriz não é significativo. Com base nesses resultados, definiu-se 37°C como temperatura de incubação da amostra visando-se manter as amostras em condições próximas as reais. Uma vez que o teste estatístico sugeriu diferença significativa entre os números de ciclos (Tabela 9), quanto ao efeito de matriz, foi escolhido o número de 10 ciclos e volume de amostra de 250 µL para as análises. Essa decisão foi tomada visando maximizar a extração da fluvastatina, por ser o analito que apresentava a menor intensidade de sinal nos cromatogramas.

4.1.5 Otimização da etapa de eluição

Um planejamento fatorial completo 2^2 foi realizado para a etapa de eluição (Tabela 5). Os diagramas de Pareto obtidos para esse planejamento estão apresentados na Figura 20.

Figura 20. Diagramas de Pareto do planejamento fatorial completo 2^2 , no qual foram avaliados o número de ciclos de eluição (4-8) e etapas de eluição (1-2). A. Pravastatina; B. Atorvastatina, C. Fluvastatina e D. Sinvastatina.

De acordo com a Figura 20 os fatores estudados não foram significativos para a extração de atorvastatina, fluvastatina e sinvastatina (Figuras 20 B, 20 C e 20 D). Apenas o fator de etapa de eluição foi significativo para a extração da pravastatina (Figura 20 A). No entanto, como o efeito é avaliado pela área do pico, o aumento provocado na recuperação quando o número de etapas é aumentado não é significativo. Dessa forma, estabeleceu-se para o método que a eluição seja realizada em uma etapa e em 4 ciclos (aspirar/dispensar).

4.2 Validação do método

4.2.1 Seletividade

Os cromatogramas das amostras de plasma branco e de solução aquosa contendo estatinas na concentração correspondente ao LOQ estão apresentados na Figura 21.

Figura 21. Cromatogramas das soluções de estatina na concentração do LOQ (à esquerda) cromatogramas das amostras de plasma branco (à direita) obtidos nos modo SRM. Condições de análise descritas no item 3.5.8.

As respostas dos picos interferentes no tempo de retenção do fármaco nas amostras de plasma branco são inferiores a 20% da resposta na concentração do LOQ para os analitos e abaixo de 5% para a rosuvastatina (padrão interno). De acordo com a norma, as amostras de plasma branco não apresentaram interferência significativa no tempo de retenção dos analitos.⁵⁷

4.2.2 Linearidade, limite de detecção e limite de quantificação

Os resultados do estudo de linearidade como: faixa linear, equações de reta, coeficientes de correlação e de determinação, bem como os limites de detecção e quantificação estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11: Tabela com os dados de linearidade para os fármacos analisados

Analitos	Faixa linear*	Dados da equação (a;b)	Coeficiente correlação (r)	Coeficiente determinação (r ²)	LOD*	LOQ*
PRA	20-200	0,467668 -1,47144	0,9947	0,9893	10,0	20,0
FLV	10-200	9,73795 -3,32987	0,9963	0,9927	5,0	10,0
AT	10-200	66,9361 -115,215	0,9962	0,9924	5,0	10,0
SV	10-200	8,8028 +22,03	0,9840	0,9684	5,0	10,0

* Concentração em ng mL⁻¹

Os coeficientes de correlação foram maiores que 0,99 enquanto que os coeficientes de determinação foram maiores que 0,98 para pravastatina, fluvastatina e atorvastatina. A sinvastatina, no entanto, apresentou coeficientes abaixo do recomendado pela norma, indicando que este fármaco não apresenta boa correlação nesse método.

As Figuras 22-25 apresentam os gráficos de resíduos para as estatinas analisadas. Podemos observar que não houve falta de ajuste para o modelo proposto.

Figura 22. Gráfico de resíduo relativo vs concentração para a pravastatina.

Figura 23. Gráfico de resíduo relativo vs concentração para a atorvastatina.

Figura 24. Gráfico de resíduo relativo vs concentração para a fluvastatina.

Figura 25. Gráfico de resíduo relativo vs concentração para a sinvastatina.

Os limites de detecção e quantificação para as estatinas foram obtidos com coeficiente de variação menor que 15%. Os valores de limite de quantificação foram de 10 a 20 ng mL⁻¹. os quais se encontram dentro da faixa de concentração máxima (C_{máx}) das estatinas (Tabela 12).⁶⁵

Tabela 12: Dados Farmacocinéticos de algumas estatinas *.

Fármaco	Ligação proteica (%)	T máx (h)	C máx (mg/mL)	pKa
ROS	88	3,0	37	4,6
AT	80-90	2,0-3,0	27-66	4,5
SV	94-98	1,3-2,4	10-34	4,3
FLV	>99	0,5-1,0	56	4,6
PRA	43-55	0,9-1,6	45-55	4,5

* Baseado em dose oral de 40 mg

Adaptado de : CORSINI, A.; BELLOSTA, S.; BAETTA, R.; FUMAGALLI, R.; PAOLETTI, R.; BERNINI, F. New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 84, n. 3, p. 413-428, 1999.

4.2.3 Precisão e Exatidão

Os resultados dos estudos de precisão e exatidão (intra-dia e inter-dia) estão apresentados na Tabela 13 e Tabela 14, respectivamente.

Tabela 13: Dados obtidos para estudo da precisão intra-dia e inter-dia dos fármacos estudados.

Analitos	Concentração (ng mL⁻¹)	Intra-dia 1 (DPR %)	Intra-dia 2 (DPR %)	Inter-dia (DPR %)
PRA	30	8,0	9,2	8,1
	120	3,7	5,0	4,3
	160	4,0	2,4	3,2
FLV	30	5,8	7,8	6,9
	120	10,0	4,1	7,9
	160	8,5	2,3	8,8
AT	30	6,9	6,9	7,8
	120	7,7	3,6	5,9
	160	5,6	6,7	7,2
SV	30	10,2	22,9	18,1
	120	11,1	24,1	18,5
	160	4,7	29,5	20,5

As estatinas, com exceção da sinvastatina, apresentaram desvio padrão relativos abaixo de 15%, demonstrando precisão adequada do método para esses analitos.

Tabela 14: Dados obtidos para estudo de exatidão intra-dia e inter-dia dos fármacos estudados.

Analitos	Concentração (ng mL⁻¹)	Intra-dia 1 (%)	Intra-dia 2 (%)	Inter-dia (%)
PRA	30	5,6	6,3	5,9
	120	9,7	7,7	8,7
	160	2,8	1,5	2,2
FLV	30	5,7	1,5	3,6
	120	2,3	7,5	4,9
	160	2,5	13,7	5,6
AT	30	0,8	7,6	3,4
	120	3,0	0,4	1,3
	160	5,6	14,2	9,9
SV	30	12,8	4,4	4,2
	120	12,5	2,3	5,1
	160	4,5	21,2	12,8

Nos estudos de exatidão as estatinas, com exceção da sinvastatina, apresentaram desvios abaixo de 15%, demonstrando exatidão adequada do método.

Como apresentado anteriormente, a sinvastatina comportou-se de forma diferente à dos outros analitos. A sua análise não apresentou boa linearidade, tampouco precisão e exatidão adequadas. O motivo por trás desse comportamento pode estar relacionado possivelmente ao à elevada taxa de ligação com as proteínas plasmáticas (Tabela 12) combinada à insuficiente quantidade de acetonitrila para eluição da sinvastatina. Na avaliação do solvente de eluição definiu-se a porcentagem de acetonitrila em 75%, considerando que neste valor já era possível observar recuperação constante para os analitos (seção 4.1.3.2). Uma porcentagem mais alta de acetonitrila foi evitada visando prevenir a eluição de interferentes. Possivelmente uma maior porcentagem de acetonitrila na etapa de eluição poderia garantir recuperações constantes para a sinvastatina.

4.2.4 Recuperação

Após a validação da precisão e exatidão do método para a análise das estatinas, foi avaliada a recuperação destas. Os resultados encontram-se sumarizados na Tabela 15.

Tabela 15: Dados obtidos da recuperação para as estatinas estudadas

Concentração \ Fármaco	Recuperação (%)			
	PRA	FLV	AT	SV
30 ng mL ⁻¹	105,8	69,3	93,6	35,4
120 ng mL ⁻¹	105,9	64,7	94,5	43,7
160 ng mL ⁻¹	100,6	51,8	103,1	32,8

A pravastatina, a atorvastatina, a fluvastatina e a sinvastatina apresentaram recuperações de 104%, 97%, 62% e 36% respectivamente. De acordo com as recomendações da ANVISA, as taxas de recuperação devem ser próximas a 100%, porém admitem-se valores menores quando a recuperação for precisa. Contudo, em trabalho de González e Herrador⁶⁶ intervalos de recuperação aceitáveis são assumidos de acordo com a concentração avaliada. Para concentrações dos analitos da ordem de 10 e 100 ng mL⁻¹ os intervalos de recuperação aceitáveis são, respectivamente, 60-115% e 80-110%. Com isso, as recuperações obtidas para as estatinas, com exceção da sinvastatina, podem ser consideradas aceitáveis.

4.2.5 Reprodutibilidade intralaboratorial e robustez

Finalmente, avaliou-se a reprodutibilidade intralaboratorial e robustez. Os resultados da primeira encontram-se na Tabela 16.

Tabela 16: Dados obtidos nos experimentos para avaliação da reprodutibilidade intralaboratorial.

Fármacos	Concentração média (ng mL⁻¹)	Precisão (DPR%)	Exatidão (%)
PRA	89,9	5,8	25,1
FLV	116,9	13,3	2,6
AT	114,8	10,1	4,3
SV	109,1	25,9	9,1

É possível observar pelos dados apresentados nessa tabela que a fluvastatina e atorvastatina apresentaram precisão e exatidão aceitáveis, visto que os valores de desvio padrão relativo e porcentagem relativa estavam abaixo de 15%. A sinvastatina apresentou apenas exatidão aceitável, o que era esperado em vista dos resultados obtidos em ensaios anteriores. A pravastatina não apresentou uma boa exatidão neste experimento embora os resultados dos ensaios anteriores tenham mostrado o contrário.

A Tabela 17 apresenta os valores obtidos de desvio padrão no teste de Youden e no ensaio de reprodutibilidade intralaboratorial.

Tabela 17: Dados obtidos para avaliação da robustez

Parâmetro Avaliado	Fármacos	Teste de Youden	Reprodutibilidade Intralaboratorial	
		(S_{Di})	(DP)	(CV %)
Concentração (ng mL ⁻¹)	PRA	9,7	5,8	11,4
	FLV	5,1	13,3	6,4
	AT	3,4	10,1	8,8
	SV	7,9	25,9	23,7
Tempo de retenção (min)	PRA	0,0173	0,0014	0,1
	FLV	0,0191	0,0028	0,2
	AT	0,0155	0,0001	0,1
	SV	0,0162	0,0016	0,1

Os dados da Tabela 17 apontam que o método se mostrou robusto frente a diferentes concentrações e tempos de retenção, visto que os desvios padrões das diferenças não foram superiores aos da reprodutibilidade intralaboratorial.

A Figura 26 apresenta graficamente quais são os fatores que possuem maior influência na concentração dos fármacos.

Figura 26. Efeito dos parâmetros avaliados na robustez para concentração dos analitos.

O pH do tampão na fase móvel (efeito D/d) apresentou maior influência para pravastatina, fluvastatina e sinvastatina, apresentando valores negativos para todas as estatinas. O pH do tampão de dessorção (efeito C/c) também apresentou influência para a maioria das estatinas, apresentando valores negativos para atorvastatina, fluvastatina e pravastatina. A grande influência do pH já era esperada,

visto que seu controle é essencial para evitar interconversão lactona/forma ácida das estatinas.

A vazão da fase móvel foi o fator que mais influenciou para fluvastatina, já para a atorvastatina foram os fatores de temperatura de incubação e temperatura do amostrador automático. Para a sinvastatina, além do efeito do pH na fase móvel a porcentagem de acetonitrila na dessorção foi outro efeito que mais influenciou em sua extração.

No ensaio da robustez em relação ao tempo de retenção os fatores não influenciaram significativamente no tempo de retenção, visto que as variações observadas foram de poucos centésimos de minuto.

5 CONCLUSÃO

O método de extração foi desenvolvido e otimizado por meio de ensaios univariados e multivariados, avaliando-se os fatores que afetam o desempenho do MEPS. A otimização utilizando planejamento fatorial mostrou-se uma ferramenta eficaz, pois possibilitou a avaliação de vários fatores e seus efeitos na resposta obtida por meio de em um número reduzido de experimentos.

O método MEPS-LC-MS/MS desenvolvido apresentou linearidade, seletividade, precisão, exatidão e recuperação adequados para as estatinas, com exceção da sinvastatina. O método desenvolvido poderá ser aplicado para a determinação de níveis tóxicos de pravastatina, fluvastatina e atorvastatina em amostras de plasma de pessoas submetidas à terapia com tais fármacos, ou em níveis terapêuticos se usado um espectrômetro de massas com melhor detectabilidade que o empregado no presente estudo.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global status report on noncommunicable diseases 2010**. Genebra, 2011. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/> >. Acesso em: 27 maio 2013.
- 2 WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Prevalence of raised blood cholesterol, ages 25+, age standardized**. Genebra, 2008. Disponível em: < http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/cholesterol_prevalence/en/ >. Acesso em: 27 maio 2013.
- 3 ROTH, G. A.; FIHN, S. D.; MOKDAD, A. H.; AEKPLAKORN, W.; HASEGAWA, T.; LIM, S. S. High total serum cholesterol, medication coverage and therapeutic control: an analysis of national health examination survey data from eight countries. **Bull World Health Organ**, v. 89, n. 2, p. 92-101, 2011.
- 4 CHEN, Y.; GUO, Z.; WANG, X.; QIU, C. Sample preparation. **Journal of Chromatography A**, v. 1184, n. 1-2, p. 191-219, 2008.
- 5 QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v. 24, p. 68-76, 2001.
- 6 FU, X.; LIAO, Y.; LIU, H. Sample preparation for pharmaceutical analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 381, n. 1, p. 75-77, 2005.
- 7 PAVLOVIĆ, D. M.; BABIĆ, S.; HORVAT, A. J. M.; KAŠTELAN-MACAN, M. Sample preparation in analysis of pharmaceuticals. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 11, p. 1062-1075, 2007.
- 8 ADAWAY, J. E.; KEEVIL, B. G. Therapeutic drug monitoring and LC–MS/MS. **Journal of Chromatography B**, v. 883-884, p. 33-49, 2012.
- 9 LANCAS, F. M. **Cromatografia líquida moderna - HPLC/CLAE**. Campinas: Editora Átomo, 2009. 313 p.
- 10 RAMOS, L. Critical overview of selected contemporary sample preparation techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 1221, p. 84-98, 2012.

- 11 RUNNQVIST, H.; BAK, S. A.; HANSEN, M.; STYRISHAVE, B.; HALLING-SØRENSEN, B.; BJÖRKLUND, E. Determination of pharmaceuticals in environmental and biological matrices using pressurised liquid extraction - Are we developing sound extraction methods? **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2447-2470, 2010.
- 12 HERRERO, M.; MENDIOLA, J. A.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2495-2511, 2010.
- 13 WILLIAMS, J.; CLIFFORD, A.; AL-SAIDI, S. R. Supercritical fluids and their applications in biotechnology and related areas. **Molecular Biotechnology**, v. 22, n. 3, p. 263-286, 2002.
- 14 HERNÁNDEZ-BORGES, J.; BORGES-MIQUEL, T. M.; RODRÍGUEZ-DELGADO, M. Á.; CIFUENTES, A. Sample treatments prior to capillary electrophoresis–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1153, n. 1-2, p. 214-226, 2007.
- 15 KOLE, P. L.; VENKATESH, G.; KOTECHEA, J.; SHESHALA, R. Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods. **Biomedical Chromatography**, v. 25, n. 1-2, p. 199-217, 2011.
- 16 BARRIONUEVO, W. R.; LANÇAS, F. M. Extração em fase sólida (SPE) e micro extração em fase sólida (SPME) de piretróides em água. **Química Nova**, v. 24, p. 172-175, 2001.
- 17 ISHIZAKI, A.; SAITO, K.; HANIOKA, N.; NARIMATSU, S.; KATAOKA, H. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in food samples by automated on-line in-tube solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography-fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 35, p. 5555-5563, 2010.
- 18 ABDEL-REHIM, M. New trend in sample preparation: on-line microextraction in packed syringe for liquid and gas chromatography applications: I. Determination of local anaesthetics in human plasma samples using gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 801, n. 2, p. 317-321, 2004.
- 19 ABDEL-REHIM, M. Current advances in microextraction by Packed Sorbent (MEPS) for bioanalysis applications. **LC-GC Europe**, v. 22, n. 1, p. 8-18, 2009.

- 20 BLOMBERG, L. Two new techniques for sample preparation in bioanalysis: Microextraction in packed sorbent (MEPS) and use of a bonded monolith as sorbent for sample preparation in polypropylene tips for 96-well plates. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 393, n. 3, p. 797-807, 2009.
- 21 ABDEL-REHIM, M. Recent advances in microextraction by packed sorbent for bioanalysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2569-2580, 2010.
- 22 ABDEL-REHIM, M.; ALTUN, Z.; BLOMBERG, L. Microextraction in packed syringe (MEPS) for liquid and gas chromatographic applications. Part II—Determination of ropivacaine and its metabolites in human plasma samples using MEPS with liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 39, n. 12, p. 1488-1493, 2004.
- 23 POLO-LUQUE, M. L.; SIMONET, B. M.; VALCÁRCEL, M. Combination of carbon nanotubes modified filters with microextraction by packed sorbent for the NACE analysis of trace levels of ionic liquids in river water samples. **Talanta**, v. 89, p. 124-128, 2012.
- 24 ADAM, M.; PAVLÍKOVÁ, P.; ČÍŽKOVÁ, A.; BAJEROVÁ, P.; VENTURA, K. Microextraction by packed sorbent (MEPS) as a suitable selective method for l-ascorbic acid determination in beverages. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1613-1618, 2012.
- 25 ABDEL-REHIM, M.; SKANSEN, P.; VITA, M.; HASSAN, Z.; BLOMBERG, L.; HASSAN, M. Microextraction in packed syringe/liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry for quantification of olomoucine in human plasma samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 539, n. 1-2, p. 35-39, 2005.
- 26 ABDEL-REHIM, M.; HASSAN, Z.; SKANSEM, P.; HASSAN, M. Simultaneous determination of busulphan in plasma samples by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry utilizing microextraction in packed syringe (MEPS) as on-line sample preparation method. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 30, n. 20, p. 3029-3041, 2007.
- 27 VITA, M.; SKANSEN, P.; HASSAN, M.; ABDEL-REHIM, M. Development and validation of a liquid chromatography and tandem mass spectrometry method for determination of roscovitine in plasma and urine samples utilizing on-line sample preparation. **Journal of Chromatography B**, v. 817, n. 2, p. 303-307, 2005.

- 28 EL-BEQQALI, A.; KUSSAK, A.; BLOMBERG, L.; ABDEL-REHIM, M. Microextraction in packed syringe/liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry for quantification of acebutolol and metoprolol in human plasma and urine samples. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 30, n. 4, p. 575-586, 2007.
- 29 PRIETO, A.; SCHRADER, S.; BAUER, C.; MÖDER, M. Synthesis of a molecularly imprinted polymer and its application for microextraction by packed sorbent for the determination of fluoroquinolone related compounds in water. **Analytica Chimica Acta**, v. 685, n. 2, p. 146-152, 2011.
- 30 PRIETO, A.; VALLEJO, A.; ZULOAGA, O.; PASCHKE, A.; SELLERGEN, B.; SCHILLINGER, E.; SCHRADER, S.; MÖDER, M. Selective determination of estrogenic compounds in water by microextraction by packed sorbents and a molecularly imprinted polymer coupled with large volume injection-in-port-derivatization gas chromatography–mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 703, n. 1, p. 41-51, 2011.
- 31 BELTRAN, A.; BORRULL, F.; MARCÉ, R. M.; CORMACK, P. A. G. Molecularly-imprinted polymers: useful sorbents for selective extractions. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 11, p. 1363-1375, 2010.
- 32 FIGUEIREDO, E. C.; DIAS, A. C. B.; ARRUDA, M. A. Z. Impressão molecular: uma estratégia promissora na elaboração de matrizes para a liberação controlada de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, p. 361-375, 2008.
- 33 CHAVES, A. R.; LEANDRO, F. Z.; CARRIS, J. A.; QUEIROZ, M. E. C. Microextraction in packed sorbent for analysis of antidepressants in human plasma by liquid chromatography and spectrophotometric detection. **Journal of Chromatography B**, v. 878, n. 23, p. 2123-2129, 2010.
- 34 RANI, S.; KUMAR, A.; MALIK, A. K.; SINGH, B. Quantification of tricyclic and nontricyclic antidepressants in spiked plasma and urine samples using microextraction in packed syringe and analysis by LC and GC-MS. **Chromatographia**, v. 74, n. 3-4, p. 235-242, 2011.
- 35 WIETECH-POŚLUŠZNY, R.; GARBACIK, A.; WOŹNIAKIEWICZ, M.; MOOS, A.; WIECZOREK, M.; KOŚCIELNIAK, P. Application of microextraction by packed sorbent to isolation of psychotropic drugs from human serum. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 402, n. 7, p. 2249-2257, 2012.

- 36 SAID, R.; POHANKA, A.; ABDEL-REHIM, M.; BECK, O. Determination of four immunosuppressive drugs in whole blood using MEPS and LC–MS/MS allowing automated sample work-up and analysis. **Journal of Chromatography B**, v. 897, p. 42-49, 2012.
- 37 SAID, R.; KAMEL, M.; EL-BEQQALI, A.; ABDEL-REHIM, M. Microextraction by packed sorbent for LC–MS/MS determination of drugs in whole blood samples. **Bioanalysis**, v. 2, n. 2, p. 197-205, 2010.
- 38 ALTUN, Z.; ABDEL-REHIM, M. Study of the factors affecting the performance of microextraction by packed sorbent (MEPS) using liquid scintillation counter and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 630, n. 2, p. 116-123, 2008.
- 39 ABDEL-REHIM, M.; ANDERSSON, L. I.; ALTUN, Z.; BLOMBERG, L. G. Microextraction in packed syringe online with liquid chromatography-tandem mass spectrometry: molecularly imprinted polymer as packing material for MEPS in selective extraction of ropivacaine from plasma. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 29, n. 12, p. 1725-1736, 2006.
- 40 ABDEL-REHIM, M.; DAHLGREN, M.; BLOMBERG, L. Quantification of ropivacaine and its major metabolites in human urine samples utilizing microextraction in a packed syringe automated with liquid chromatography-tandem mass spectrometry (MEPS-LC-MS/MS). **Journal of Separation Science**, v. 29, n. 11, p. 1658-1661, 2006.
- 41 SEMENISTAYA, E.; VIRUS, E.; RODCHENKOV, G. Determination of sulfates and glucuronides of endogenic steroids in biofluids by high-performance liquid chromatography/orbitrap mass spectrometry. **Russian Journal of Physical Chemistry A, Focus on Chemistry**, v. 83, n. 4, p. 530-536, 2009.
- 42 ANIZAN, S.; BICHON, E.; MONTEAU, F.; CESBRON, N.; ANTIGNAC, J.-P.; LE BIZEC, B. A new reliable sample preparation for high throughput focused steroid profiling by gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 43, p. 6652-6660, 2010.
- 43 ANIZAN, S.; BICHON, E.; DUVAL, T.; MONTEAU, F.; CESBRON, N.; ANTIGNAC, J.-P.; LE BIZEC, B. Gas chromatography coupled to mass spectrometry-based metabolomic to screen for anabolic practices in cattle: identification of 5 α -androst-2-en-17-one as new biomarker of 4-androstenedione misuse. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 47, n. 1, p. 131-140, 2012.

- 44 SZULTKA, M.; KRZEMINSKI, R.; SZELIGA, J.; JACKOWSKI, M.; BUSZEWSKI, B. A new approach for antibiotic drugs determination in human plasma by liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1272, p. 41-49, 2013.
- 45 VLČKOVÁ, H.; RABATINOVÁ, M.; MIKŠOVÁ, A.; KOLOUCHOVÁ, G.; MIČUDA, S.; SOLICH, P.; NOVÁKOVÁ, L. Determination of pravastatin and pravastatin lactone in rat plasma and urine using UHPLC-MS/MS and microextraction by packed sorbent. **Talanta**, v. 90, p. 22-29, 2012.
- 46 VLČKOVÁ, H.; SOLICHOVÁ, D.; BLÁHA, M.; SOLICH, P.; NOVÁKOVÁ, L. Microextraction by packed sorbent as sample preparation step for atorvastatin and its metabolites in biological samples - Critical evaluation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, n. 2, p. 301-308, 2011.
- 47 KATAOKA, H. New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 4, p. 232-244, 2003.
- 48 KANG, J.; LEE, M. Overview of therapeutic drug monitoring. **The Korean Journal of Internal Medicine**, v. 24, n. 1, p. 1-10, 2009.
- 49 CAMPO, V. L.; CARVALHO, I. Estatinas hipolipêmicas e novas tendências terapêuticas. **Química Nova**, v. 30, p. 425-430, 2007.
- 50 VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. D. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, p. 326-337, 2006.
- 51 RITT, L. E. F.; GUIMARÃES, H. P.; AVEZUM, Á.; VIEGAS, L. S. Estatinas na sepse: nova arma terapêutica no arsenal da medicina intensiva? **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 18, p. 402-406, 2006.
- 52 SCHACHTER, M. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 19, n. 1, p. 117-125, 2005.
- 53 SIQUEIRA, M. E. M.; FRANICALACCI, L. C.; PEREIRA, C. G. Acute renal failure and Rhabdomyolysis induced by statin. Case report. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, v. 6, p. 273-275, 2008.
- 54 ARONSON, J. K.; HARDMAN, M. ABC of monitoring drug therapy. Measuring plasma drug concentrations. **BMJ**, v. 305, n. 6861, p. 1078-1080, 1992.

- 55 MATUSZEWSKI, B. K.; CONSTANZER, M. L.; CHAVEZ-ENG, C. M. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 13, p. 3019-3030, 2003.
- 56 TRUFELLI, H.; PALMA, P.; FAMIGLINI, G.; CAPPIELLO, A. An overview of matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 30, n. 3, p. 491-509, 2011.
- 57 BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Resolução RE nº 899 de 29/05/2003. **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 de junho de 2003. Seção 1, p. 56.
- 58 GONZALEZ, O.; IRIARTE, G.; RICO, E.; FERREIRÓS, N.; MAGUREGUI, M. I.; ALONSO, R. M.; JIMÉNEZ, R. M. LC-MS/MS method for the determination of several drugs used in combined cardiovascular therapy in human plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 878, n. 28, p. 2685-2692, 2010.
- 59 ZHAO, J. J.; XIE, I. H.; YANG, A. Y.; ROADCAP, B. A.; ROGERS, J. D. Quantitation of simvastatin and its β -hydroxy acid in human plasma by liquid-liquid cartridge extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 35, n. 9, p. 1133-1143, 2000.
- 60 SHAH, Y.; IQBAL, Z.; AHMAD, L.; KHAN, A.; KHAN, M. I.; NAZIR, S.; NASIR, F. Simultaneous determination of rosuvastatin and atorvastatin in human serum using RP-HPLC/UV detection: Method development, validation and optimization of various experimental parameters. **Journal of Chromatography B**, v. 879, n. 9-10, p. 557-563, 2011.
- 61 CÉSAR, I. D. C.; PIANETTI, G. A. Robustness evaluation of the chromatographic method for the quantitation of lumefantrine using Youden's test. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, p. 235-240, 2009.
- 62 EUROPEAN COMMISSION. Commission Decision 2002/657/EC. **Official Journal of the European Communities**, seção L221, p. 8-36, 2002.
- 63 NOVÁKOVÁ, L.; ŠATÍNSKÝ, D.; SOLICH, P. HPLC methods for the determination of simvastatin and atorvastatin. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, n. 4, p. 352-367, 2008.
- 64 DĄBKOWSKA, M.; ADAMCZYK, Z. Human serum albumin monolayers on mica: electrokinetic characteristics. **Langmuir**, v. 28, n. 44, p. 15663-15673, 2012.

65 CORSINI, A.; BELLOSTA, S.; BAETTA, R.; FUMAGALLI, R.; PAOLETTI, R.; BERNINI, F. New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 84, n. 3, p. 413-428, 1999.

66 GONZÁLEZ, A. G.; HERRADOR, M. Å. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 3, p. 227-238, 2007.